EFFETS DES LEVURES *SACCHAROMYCES BOULARDII* SUR LES TROPHOZOÏTES D'*ENTAMOEBIA HISTOLYTICA* *IN VITRO* ET DANS L'AMIBIASE CAECALE DU JEUNE RAT

M. C. RIGOTHIER*, J. MACCARIO**, P. N. VUONG***, Ph. GAYRAL*

RÉSUMÉ

Un modèle original d'amibiase cœcale mis au point chez le raton a été utilisé pour étudier l'effet de la levure *Saccharomyces boulardii* sur le développement des lésions. Des ratons infectés par *Entamoeba histolytica* ont été traités par *Saccharomyces boulardii*; chez les traités, le nombre de ratons malades est significativement

moins élevé, la gravité de l'affection, appréciée par l'aspect macroscopique du cœcum et la présence d'amibes a été diminuée. Les lésions observées sont semblables à celles des animaux témoins, mais leur processus de cicatrisation est accéléré. Par ailleurs, *Saccharomyces boulardii* n'a pas d'action amœbicide *in vitro*.

SUMMARY: Effects of *Saccharomyces boulardii* yeast on trophozoites of *Entamoeba histolytica* *in vitro* and on cecal amebiasis in the young rat.

Lyophilized and rehydrated *Saccharomyces boulardii* yeasts were administered to young rats previously inoculated into the cecum with *Entamoeba histolytica*. The numbers of diseased young rats and the severity of the infection, assessed from the appearance of the cecum and its content of mucus and amebae, were signifi-

cantly reduced by the treatment. The lesions observed resembled those seen in the untreated controls, although healing was faster in the treated animals. *Saccharomyces boulardii* had no intrinsic amebicidal action *in vitro*.

INTRODUCTION

La levure *Saccharomyces boulardii*, lorsqu'elle est introduite vivante dans le tube digestif de rongeurs gnotoxéniques, possède un effet antagoniste vis-à-vis des germes présents, comme *Candida* ou *Escherichia coli*, en réduisant leurs populations dans des proportions importantes (Ducluzeau et Bensaada, 1982; Massot *et al.*, 1977). Elle protège aussi de la colite pseudo-membraneuse induite par la Clindamycine chez le Hamster (Toothaker et Elmer, 1984). Aucune étude n'a encore été réalisée sur les rapports éventuels entre l'amibe intestinale *Entamoeba histolytica* et cette levure.

Il a donc paru intéressant d'étudier son influence sur les populations d'amibes. Une action proprement toxique ou inhibitrice de la levure pourra être détectée par un

contact direct avec les amibes en culture. Mais c'est surtout l'essai *in vivo* qui est nécessaire, pour apprécier l'incidence de l'administration orale de la levure sur la population de trophozoïtes intestinaux et sur leur pouvoir pathogène dans une lésion de la muqueuse.

Ces essais sont donc réalisés avec le modèle de l'amibiase du raton (Rigothier *et al.*, 1989; Vinayak *et al.*, 1977) reproduisant après inoculation intra-cœcale de trophozoïtes virulents, une lésion de la paroi se rapprochant de l'amibiase colique de l'Homme (Pittmann *et al.*, 1975). On ne peut dénombrer ni suivre facilement les populations d'amibes comme celles de bactéries ou de levures à partir des selles des animaux, mais lors de l'autopsie des ratons, l'examen microscopique des cœcums et leur mise en culture donne une bonne indication sur la richesse des prélèvements en amibes.

Pour être plus proches des conditions naturelles, les amibes sont utilisées en association avec des bactéries. Il a donc été nécessaire d'évaluer l'effet spécifique de la culture microbienne après isolement. Pour préciser l'effet de ces facteurs : amibes, levures, bactéries d'accompagnement, un examen anatomo-pathologique systématique des cœcums de raton a été réalisé. Ainsi les différentes observations vont permettre de déterminer l'influence des levures sur le pouvoir pathogène d'*Entamoeba histolytica*.

* Laboratoire de Parasitologie.

** Laboratoire de Biomathématiques, Faculté de Pharmacie, Université Paris XI, F 92290 Châtenay-Malabry.

*** Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Saint-Michel, 33, rue Olivier-de-Serres, F 75015 Paris.

Accepté le : 23 avril 1990.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 — MATÉRIEL ET SOUCHES

a — Amibes

Entamoeba histolytica souche Rahman nous a été fourni par le laboratoire de parasitologie, Rhône-Poulenc Santé (Vitry, France). Elle est cultivée en association avec une entérobactérie sur Milieu Dobell et Laidlaw (Taylor et Baker, 1968) contenant du sérum coagulé, une solution de Ringer, et de l'amidon de riz (Institut Pasteur, réf. 56675). La même souche est utilisée pour les essais *in vitro* et *in vivo*.

Les trophozoïtes sont comptés sur des cultures de 48 heures. Après centrifugation (Sorvall RC 5B, Dupont Instruments) 10 minutes 1 000 RPM, le culot est dilué au dixième dans NaCl 0,05 M et compté au microscope dans une cellule de Malassez (Prolabo réf. 05 711 000). Le pouvoir pathogène *in vivo* est vérifié tous les mois par l'essai de l'abcès amibien hépatique du hamster (Woolfe, 1963; Lushbaugh *et al.*, 1978). Une nouvelle souche est régulièrement réisolée à partir de l'abcès hépatique formé et maintenue en culture jusqu'à ce que sa virulence décroisse.

b — Bactéries associées à la culture d'amibes

La souche bactérienne associée à *Entamoeba histolytica* a été identifiée comme *Citrobacter diversus* (Enterobacteriaceae, Salmonellae). Elle se développe facilement sur gélose nutritive (Biokar réf. BK 21). La numération des germes s'effectue après culture sur gélose nutritive avec des dilutions croissantes d'une suspension bactérienne (10^{-1} à 10^{-10}) par le dénombrement au bout de 24 heures à 37° C des colonies formées.

C — Levures

La levure *Saccharomyces boulardii* (IP n° i-745) est produite en culture sur les milieux habituels pour levures. Pour notre part, nous la cultivons sur milieu de Sabouraud-dextrose (Difco réf. 0382 17-9) à pH 6 et à 30° C sous agitation (400 t/minute) et aération (2 l d'air par litre de milieu par minute).

En fin de fermentation, les levures sont récupérées par filtration et ensuite la préparation est lyophilisée et conservée au sec. Les levures lyophilisées sont régénérées par mise en suspension dans une solution aqueuse stérile de NaCl 0,05 M isotonique aux levures. Lors des manipulations, il a été observé que la forme lyophilisée contenait habituellement $1-10^{11}$ cellules par gramme dont seule une certaine proportion est vivante. Pour déterminer ce pourcentage une mise en culture est réalisée en milieu de Sabouraud-dextrose gélosé (Difco réf. 109) et les colonies sont dénombrées au bout de 3 jours, et rapportées au poids initial de levures. Ce pourcentage, déterminé avant chaque essai, est pris en compte dans les numérations de levures régénérées. Les levures lyophilisées nous ont été fournies par le laboratoire Biocodex, Mont-rouge.

d — Rats

C. D. R. Sprague Dawley (Laboratoire Charles Rivers, 76410 Cléon, France). Les rats utilisés, mâle et femelle, sont pris dès le sevrage et pèsent de 35 à 40 g. Pendant toute la durée de l'étude, ils sont maintenus dans une enceinte décontaminée. La boisson et la sciure ont été stérilisées au préalable pour minimiser les risques d'infection par *Entamoeba muris*. Par ailleurs, une recherche d'*Entamoeba muris* est effectuée sur les rats par examen direct ou après concentration par le formol et l'éther.

2 — RECHERCHE D'UNE ACTIVITÉ AMÉBICIDE *in vitro*

Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) empêchant la multiplication des amibes, 5 ml de milieu monophasique liquide de Pavlova-Jones (Taylor et Baker, 1968) sont ensemencés avec 10 000 trophozoïtes/ml. Les levures lyophilisées sont mises en suspension dans un faible volume de NaCl 0,05 M et ajoutées à des concentrations de 1 à 100 mg/ml soit 1×10^8 à 1×10^{10} cellules vivantes/ml dans le milieu. Les tubes sont ensuite incubés à 37° pendant 48 heures. Chaque essai est réalisé 2 fois. Le dénombrement des amibes, effectué par examen microscopique, permet alors de déterminer la CMI.

3 — MÉTHODOLOGIES *in vivo*

Les animaux en expérimentation ont été groupés en plusieurs séries. En effet, pour obtenir l'installation et le développement des lésions les rats doivent être infectés par une souche d'amibes pathogènes avec sa flore d'accompagnement. Certains lots de rats amibiens ont été traités par les levures, et comparés à des groupes non traités, et cet essai a été répété plusieurs fois. Par ailleurs, les effets particuliers de la flore d'accompagnement, des levures seules et de leur association ont été évalués sur des rats non amibiens. Ainsi pourra être précisée la part respective de ces éléments dans l'apparition et l'évolution des lésions amibiennes cœcales. En outre, lors des dernières séries d'essais, en particulier avec les témoins, un examen anatomo-pathologique a été réalisé pour pouvoir comparer les scores basés sur l'appréciation à l'examen direct des cæcums avec le nombre et la gravité des lésions microscopiques. Ces lésions ont déjà été décrites en détail précédemment (Rigother *et al.*, 1989).

a — Infection des rats

Le mode d'infection des rats est le même lors de tous les essais. Le protocole d'infection est proche de celui de Woolfe, 1963. Les rats au sevrage sont nourris avec un lait en poudre écrémé courant, des pommes et ont de l'eau *ad libitum*. La veille de l'expérimentation, ils sont mis à la diète hydrique après avoir reçu 0,1 ml d'une solution saturée de sulfate de magnésium pour provoquer une certaine vacuité intestinale (Ray et Chatterjee, 1980).

A J₁, les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de 25 mg/kg de Pentobarbital Sodique (solution à 6 %, laboratoire Clin Midy Vétérinaire. Après laparotomie, le cæcum est dégagé et légèrement irrité par frottement. L'injection des amibes gnotoxéniques ou des bactéries est réalisée sans effraction du cæcum (Rigother *et al.*, 1989) pour éviter la possibilité d'abcès de paroi d'origine iatrogène. Après inoculation, la plaie chirurgicale est suturée en deux plans musculaire et cutané. Les animaux récupèrent en 2 à 3 heures et sont à nouveau réunis dans les cages et reçoivent la même alimentation. La mortalité enregistrée dans les 24 premières heures est inférieure à 10 %.

b — Constitution des lots expérimentaux et traitements

Plusieurs lots de 10 à 12 animaux ont donc été constitués en fonction des essais :

— Les rats « contrôles amibiens » ont été infectés par 5×10^5 trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*, associés à la flore bactérienne d'accompagnement. Ce sont les témoins du pouvoir pathogène des amibes.

— Les rats « amibiens traités », infectés comme les contrôles amibiens, reçoivent les levures *Saccharomyces boulardii*. Les levures sont administrées à la posologie de 1,5 g/kg/jour en suspension dans NaCl 0,05 M. Cette dose correspond à environ $1,8 \times 10^9$ levures vivantes par rat. Le traitement est effectué à la canule

gastrique en deux doses quotidiennes (10 h et 18 h) de 0,2 ml par raton. Le traitement débute dès le lendemain de l'inoculation des amibes (J_1) et dure quatre jours (J_2 et J_3). L'évaluation de l'activité des levures a été répétée dans 3 essais successifs dans les mêmes conditions expérimentales. La répartition des ratons amibiens entre le groupe traité et le groupe contrôle a été faite au hasard.

— Les ratons « témoins flore bactérienne » ont reçu dans le cæcum 5×10^8 *Citrobacter diversus*, ce qui correspond au nombre de bactéries accompagnant l'inoculum de *Entamoeba histolytica* lors des infections habituelles.

— Les ratons « témoins levures » ont reçu le même nombre de levures que les ratons traités, c'est-à-dire $1,8 \times 10^9$ cellules vivantes par animal par jour selon le même protocole.

— Enfin le dernier lot « témoins flore bactérienne plus levures » a reçu selon les mêmes protocoles les mêmes nombres de bactéries et de levures qu'indiqué ci-dessus.

C — Autopsie et examen anatomo-pathologique

L'examen anatomo-pathologique des cæcums a été réalisé uniquement lors du dernier essai avec *Saccharomyces boulardii* (essai 3 : ratons contrôles 1 à 12, traités 13 à 23), et sur les groupes témoins levures, bactéries et association levures plus bactéries (essai 4, 5 et 6).

Les animaux sont sacrifiés 5 jours après l'inoculation (J_5) par anesthésie prolongée à l'éther et autopsiés à l'aveugle. Le cæcum a été fendu longitudinalement et divisé en 2 parties pour examen direct et histologique selon les techniques décrites (Rigothier *et al.*, 1989) rappelées ici brièvement :

Examen direct du cæcum : l'aspect macroscopique du cæcum et l'importance de la population d'amibes définissent un indice de gravité (tableau I), inspiré de celui de Woolfe, 1963 mais prenant plus en compte la réaction tissulaire de la paroi intestinale. 4 paramètres sont appréciés pour déterminer l'indice de gravité :

TABLEAU I. — Système d'évaluation de l'indice de gravité de l'amibiase cæcale du raton.

ASPECT MACROSCOPIQUE DU CAECUM	AMIBES PRESENTES A L'EXAMEN DIRECT		Aucune Amibe après culture
	Nombreuses	Rares	
Petit ou rétracté Paroi épaissie Mucus abondant	5	4	0
Petit ou rétracté Paroi épaissie Mucus en quantité normale	4	3	0
Normal Paroi épaissie Mucus abondant	4	3	0
Normal Paroi normale Mucus abondant	3	2	0
Normal Contenu normal	2	1	0

1 — L'aspect du cæcum (normal ou rétracté).

2 — L'épaisseur de la paroi (normalement fine souvent épaissie et oedématisée).

3 — La présence de mucus abondant.

4 — La présence d'*Entamoeba histolytica* recherché par l'examen microscopique direct du produit de raclage de la paroi et dans le mucus. En outre, après élimination des résidus digestifs ne contenant jamais d'*Entamoeba histolytica*, le cæcum est mis en culture dans un milieu pour amibes à 37° qui sera observé après 48 h. Ceci augmente la probabilité de découvrir des amibes dans le cæcum. Cette culture permet aussi de tenir compte dans nos résultats d'une éventuelle contamination des ratons par *Entamoeba muris*, morphologiquement très proche d'*Entamoeba histolytica* mais qui ne se multiplie pas dans ces conditions de culture.

Examen histologique : le reste du cæcum est fixé au formol (10 % dans le PBS pH 7,2) débité en quatre niveaux et inclus en totalité dans la paraffine. Les coupes de 5 μ m d'épaisseur sont colorées à l'hématéine-éosine-safran (H. E. S.) et à l'acide périodique Schiff (P. A. S.). L'examen histologique permet d'apprécier l'importance et le nombre des diverses lésions : colite interstitielle, érosive, abcès aigu ou détergé (Rigothier *et al.*, 1989; Anand *et al.*, 1985; Gill *et al.*, 1984; Anaya-Velazquez *et al.*, 1985; Chadee et Meerovitch, 1984; Chadee et Meerovitch, 1985; Vinayak *et al.*, 1977).

d — Analyse statistique

L'appréciation d'une différence des indices de gravité entre les lots expérimentaux ne peut se faire par la comparaison d'un indice moyen. En effet, l'indice de gravité n'est pas une variable continue et sa distribution n'est pas connue. La comparaison se fait en regroupant les animaux en 3 catégories, guéris : indices de gravité 0; peu atteints : indices de gravité 1-2-3; très atteints : indices de gravité 4-5.

La répartition des animaux dans les 3 classes et en fonction du traitement est analysée par la méthode du χ^2 pour petits échantillons.

RÉSULTATS

1 — EFFET AMÉBICIDE *in vitro*

Une activité inhibitrice apparaît à des concentrations en levures élevées de l'ordre de 50 g/litre. Cette concentration est beaucoup trop forte pour qu'existe un effet amébicide direct de la levure et l'estimation de la DL50 n'aurait pas de sens.

2 — ESSAIS *in vivo*

Le protocole utilisé *in vivo* a permis d'obtenir une infection régulière et reproductible des ratons, par l'utilisation d'une souche *Entamoeba histolytica* dont la virulence est régulièrement contrôlée et exaltée par passage sur foie de hamster.

Les ratons contrôles amibiens (tableaux II et III) ont un indice de gravité le plus souvent élevé 4 ou 5. Dans la plupart des cas, le cæcum est rétracté avec une paroi épaissie : la présence de mucus en abondance est pratiquement constante. Les trophozoïtes sont présents dans la

TABLEAU II. — Effets des levures *Saccharomyces boulardii* chez les rats infectés par *Entamoeba histolytica*.

	ESSAI 1		ESSAI 2		ESSAI 3	
	Rat témoin	Rat traité	Rat Témoin	Rat Traité	Rat Témoin	Rat Traité
Nombre de rats avec un indice de gravité 0	1	6	1	10	1	7
Nombre de Rats avec un indice de gravité de 1-2 ou 3	0	3	7	2	3	4
Nombre de Rats avec un indice de gravité de 4 ou 5	8	1	5	1	8	0
Valeur du X ²	14.27		14.40		12.46	
Significativité de l'essai	p < 0.001		p < 0.001		P < 0.01	

Pour chaque essai, les rats sont répartis dans les trois classes d'indice de gravité selon la valeur de leur indice individuel. On apprécie l'efficacité du traitement (quel qu'il soit) par les modifications de cette répartition pour les différents lots d'un même essai.

Tous les rats ont été infectés par 5.10^5 trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* à J1.

Les rats traités ont reçu en outre $1,8 \times 10^9$ levures vivantes par jour pendant 4 jours.

Ils sont autopsiés 5 jours après infestation. Les indices de gravité sont déterminés par l'examen direct du cæcum.

La signification de l'essai est déduite d'un test de X² entre les séries d'animaux témoin et traité.

TABLEAU III. — Amibiase cæcale du raton.

N° D'IDENTIFICATION DU RATON	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EXAMEN DIRECT DU CAECUM												
Aspect	R	N	R	R	N	R	N	R	R	R	HT	R
Épaisseur de la paroi	++	+	++	++	+	++	+	++	++	++	+	++
Sécrétion du mucus	++	+	+++	+++	++	++	+	+++	++	+++	+	+++
Densité en trophozoïtes	++	++	+++	++	++	++	++	++++	++++	++	0	++
Indice de gravité	4	3	4	4	3	4	3	5	5	4	0	4
HISTOLOGIE DU CAECUM :												
Colite interstitielle	1			1	1			1	2			1
Colite érosive			1		1	1	1	1	1			1
Abcès aigu				1		1		1	1	1		
Abcès détergé	1		1	1								1

Étude comparative des aspects macroscopiques, microscopiques et histologiques du cæcum chez des rats infectés par *E. histolytica*, souche gnotoxénique à J1, autopsiés 5 jours après l'infection (J6). Essai 3.

— Aspect du cæcum :

- * Cæcum : normal (N), rétracté (R), hypertrophié (HT)
- * Épaisseur de la paroi : normale (N) ou augmentée (+ à +++)
- * Sécrétion du mucus : normale (N) ou augmentée (+ à +++)
- * Trophozoïtes : 0 à ++++.

— Histologie du cæcum :

Les chiffres des lésions microscopiques indiquent leur fréquence sur les coupes de cæcum à 4 niveaux différents.

glairé, parfois en véritables placards. La culture du cæcum est positive mais sans que le rendement au bout de 48 h ne reflète le tapis de trophozoïtes observés à frais.

L'examen histologique montre des amibes dans la lumière cæcale (fig. 1) accompagnées d'un mucus abondant au contact de l'épithélium de la muqueuse et dans la lumière

TABLEAU IV. — Évaluation de l'effet de *Saccharomyces boulardii* dans l'amibiase cæcale du raton.

N° D'IDENTIFICATION DU RATON	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
EXAMEN DIRECT DU CAECUM											
Aspect	N	HT	HT	N	HT	HT	N	N	N	N	N
Épaisseur de la paroi	+	N	++	N	N	N	N	N	N	N	N
Sécrétion du mucus	++	+	++	+	++	++	+	+	+	+	+
Densité en trophozoïtes	++	0	0	0	++	0	0	0	++	0	+++
Indice de gravité	3	0	0	0	3	0	0	0	2	0	3
HISTOLOGIE DU CAECUM :											
Colite interstitielle					2						1
Colite érosive	1										
Colite érosive réparée	1				1						
Abcès aigu									2		
Abcès détergé											1

Étude comparative des aspects macroscopiques, microscopiques et histologiques du cæcum chez des ratons infectés par *E. histolytica*, souche gnotoxénique à J1, traités par *Saccharomyces boulardii* (1,5 g/kg/j) 4 jours consécutifs (J2 à J5) et autopsiés à J6. Essai 3.

— Aspect du cæcum :

- * Cæcum : normal (N), rétracté (R), hypertrophié (HT)
- * Épaisseur de la paroi : normale (N) ou augmentée (+ à +++)
- * Sécrétion du mucus : normale (N) ou augmentée (+ à +++)
- * Trophozoïtes : 0 à ++++.

— Histologie du cæcum :

Les chiffres des lésions indiquent leur fréquence sur les coupes de cæcum à 4 niveaux différents.

TABLEAU V. — Évaluation de l'action des témoins d'infection sur l'amibiase cæcale du raton.

	Essai4	Essai5	Essai6
NOMBRE DE RATONS	11	11	10
EXAMEN DIRECT DU CAECUM :			
Aspect rétracté	1	0	0
paroi épaissie	2	0	1
Sécrétion de mucus augmentée	4	2	4
HISTOLOGIE DU CAECUM :			
Réaction congestive de la muqueuse	8	4	5
Lésion érosive	0	0	0

Essai 4 : Flore d'accompagnement : 5.10^8 *Citrobacter diversus*.

Essai 5 : Levure *S. boulardii* seule, $1,8.10^9$ cellules vivantes pendant 4 jours.

Essai 6 : Association bactéries plus levures.

Nombre d'animaux présentant la réaction indiquée.

cæcale (fig. 2). 6 animaux sur 12 présentent une colite interstitielle (tableau III). Les lésions érosives se manifestent

d'abord sous forme d'une ulcération (figs. 3, 4, 5) pouvant évoluer jusqu'à l'abcès (fig. 6). La colite érosive est observée chez 7 animaux sur 12. Son diamètre est variable parfois punctiforme, ailleurs large jusqu'à 200 μ m à bords nets. 8 animaux présentent des abcès, aigus chez 5 d'entre eux, détergés chez les autres (fig. 7) avec chez un animal coexistence des 2 formes, abcès aigu et détergé. Dans ce lot, on a observé la guérison spontanée d'un seul raton mise en évidence par l'absence d'*Entamoeba histolytica* même après culture bien qu'il ait présenté quelques signes d'une maladie en voie de guérison spontanée (mucus présent mais peu abondant et paroi peu épaissie). Les amibes observées à l'examen direct étaient rares et immobiles. A l'examen histologique, la muqueuse présente des signes de congestion évoquant un début de colite interstitielle. Le mécanisme de cette guérison n'est pas élucidé; le poids de ces ratons n'est pas différent de celui des autres animaux de ces lots.

L'effet de *Saccharomyces boulardii* est mis en évidence par les résultats des trois essais réalisés avec les ratons amibiens traités (tableau II). Il se manifeste, à l'examen direct, par une augmentation du nombre d'animaux dépourvus d'amibes et une diminution forte du nombre des animaux très atteints avec des indices 4 ou 5. La différence est hautement significative avec un χ^2 supérieur à 12 pour chacun des 3 essais.

Lors de l'examen histologique, on retrouve chez ces animaux l'évolution en trois étapes, colite interstitielle, colite

érosive et abcès. Mais, comparativement aux rats contrôles non traités, on observe une diminution de la fréquence des lésions (*tableaux III et IV*) : la colite interstitielle est retrouvée chez 2 animaux sur 11 dans le lot traité contre 6 sur 12 chez les non traités. De même, une colite érosive est observée chez 2 rats traités sur 11, alors que les contrôles sont à 7 sur 12. L'un des animaux présente même une réparation de surface (*fig. 8*). Enfin, les abcès sont présents chez 2 animaux sur 11 amibiens traités contre 8 sur 12 chez les contrôles, et tous sont détergés (*fig. 9*). Ailleurs la muqueuse présente une hypersécrétion de mucus associée à une dégénérescence des amibes lumenales (*fig. 10*).

Les trois lots témoins « flore bactérienne d'accompagnement », « levures », et « bactéries plus levures » ont un indice de gravité de 0 puisqu'ils n'hébergent pas d'amibes (*tableau V*). L'examen histologique montre chez quelques animaux une hypersécrétion de mucus. Il n'y a jamais de lésion érosive, tout au plus une colite interstitielle chez certains animaux (*figs. 11, 12, 13, 14*).

DISCUSSION

Les lésions que nous avons décrites chez les rats infectés par la souche gnotoxénique d'amibes présentent des similitudes avec celles décrites dans l'amibiase humaine (Pittman *et al.*, 1975) et chez le cobaye (Anand *et al.*, 1985; Gill *et al.*, 1984; Anaya-Velazquez *et al.*, 1985), la gerbille (Chadee et Meerovitch, 1984 et 1985), et le rat blanc (Leitch *et al.*, 1985), parasités avec des souches axéniques ou monoxéniques. L'introduction des trophozoïtes dans le cæcum entraîne une sécrétion abondante de mucus par les cellules caliciformes (Rigothier *et al.*, 1989; Chadee et Meerovitch, 1984 et 1985; Leitch *et al.*, 1985; Takeuchi *et al.*, 1977). La muqueuse intestinale est d'abord le siège d'une réaction inflammatoire avec un afflux de polynucléaires et lymphocytes (Anand *et al.*, 1985; Gill *et al.*, 1984; Chadee et Meerovitch, 1984 et 1985; Pittman *et al.*, 1975). Les lésions de colite érosive et d'abcès correspondent à une extension en surface et en profondeur (Rigothier *et al.*, 1989; Anand *et al.*, 1985; Gill *et al.*, 1984), après rupture de l'épithélium intestinal par les trophozoïtes (Rigothier *et al.*, 1989; Anand *et al.*, 1985; Chadee et Meerovitch, 1984 et 1985; Vinayak *et al.*, 1977; Pittman *et al.*, 1975).

Nous avons observé des analogies ou des convergences entre l'aspect macroscopique du cæcum (qui permet de déterminer l'indice de gravité) et les lésions histologiques (Rigothier *et al.*, 1989; Vinayak *et al.*, 1977). Ainsi tous les animaux qui ont un indice de gravité de 0 sont également dépourvus de lésion microscopique. L'extension des lésions dans la paroi cæcale est responsable de l'épaississement pariétal et de la rétraction du cæcum observée à l'œil nu. Les animaux qui ont des indices de gravité élevés (indice 4-5) présentent le plus souvent des lésions aiguës avec abcès en profondeur.

Le pouvoir pathogène est bien dû aux amibes puisque la flore d'accompagnement inoculée seule n'entraîne aucune lésion. Les bactéries participent au maintien de la vitalité de la souche en fournissant les conditions de culture et l'apport nutritionnel favorables à leur croissance (Philipps *et al.*, 1985). Elles pourraient aussi interférer sur le potentiel de virulence de l'amibe (Mirelman, 1987), mais elles n'ont donc pas d'activité cytopathogène propre.

L'effet de la levure *Saccharomyces boulardii* est très net : les résultats expérimentaux démontrent une diminution signi-

ficative.

FIG. 1. — (Animal 3). La lumière cæcale présente de nombreuses amibes ➔. HES × 300. Barre 60 µm.

FIG. 2. — (Animal 3). La muqueuse cæcale présente une hyperécrétion réalisant un tapis de mucus englobant les amibes. (★ : mucus). HES × 350. Barre 45 µm.

FIG. 3. — (Animal 9). Pénétration des amibes ➔ dans la lumière des glandes cæcales. HES × 400. Barre 38 µm.

FIG. 4. — (Animal 9). Lésion de colite érosive débutante avec pénétration des amibes ➔ dans le chorion de la muqueuse cæcale. HES × 380. Barre 42 µm.

FIG. 5. — (Animal 9). Lésion de colite érosive constituée, réalisant une ulcération à bord net laissant intacte la musculaire muqueuse. Cette ulcération est tapissée par un enduit fibrino-leucocytaire. (* : ulcération). HES × 300. Barre 60 µm.

FIG. 6. — (Animal 8). L'extension du processus inflammatoire dans la sous-muqueuse et la musculature donne naissance à un abcès amibien. (* : abcès). HES × 80. Barre 225 µm.

FIG. 7. — (Animal 4). L'abcès détergé comporte de nombreuses cellules mononuclées lympho-histiocytaires. HES × 60. Barre 300 µm.

ficative du nombre et de la gravité des lésions. En parallèle une accélération de la cicatrisation des lésions est observée dès le 6^e jour, alors qu'il faut attendre le 21^e jour chez les rats amibiens non traités (Rigothier *et al.*, 1989), les lésions étant identiques morphologiquement. Mais l'effet observé n'est pas absolu puisque, dans un aucun essai, nous n'obtenons 100 % d'animaux guéris et totalement débarrassés de leurs amibes. D'autres protocoles ont été essayés, cependant il est peu vraisemblable qu'une relation effet-dose existe.

Il est difficile dès à présent d'interpréter le rôle précis de la levure dans la diminution du pouvoir pathogène d'*Entamoeba histolytica*. Plusieurs hypothèses peuvent en effet être proposées et certaines sont étudiées actuellement. La levure pourrait posséder un pouvoir amœbicide intrinsèque, étant elle-même active par des métabolites ou des constituants internes : l'absence d'effet observée *in vitro* infirme cette hypothèse. L'effet des levures pourrait donc être plutôt dû à une modification d'une des trois étapes successives du pouvoir pathogène : adhésion, effet cytolytique et phagocytose (Perez-Tamayo, 1986; Mora-Galindo *et al.*, 1982; Sepulveda, 1982; Ravdin et Guerrant, 1982; Laughlin et Aley, 1985; Martinez-Palomo *et al.*, 1985).

Le contact amibe-cellule cible est le facteur initial indispensable à l'expression de l'effet cytopathogène (Mora-Galindo *et al.*, 1978; Ravdin *et al.*, 1980; Orozco *et al.*, 1982). Ce contact peut être perturbé par la production abondante de mucus au niveau de la muqueuse et dans la lumière cœcale constituant une barrière mécanique et biochimique contre l'invasion des amibes (Chadee et Meerovitch, 1985; Leitch *et al.*, 1985; Leitch *et al.*, 1988; Mirelman *et al.*, 1983; Ravdin *et al.*, 1985). Les amibes « engluées et entraînées » par le mucus réapparaîtraient dans la lumière cœcale plusieurs heures plus tard (Leitch *et al.*, 1985), ce qui

retarderait ou empêcherait leur adhésion aux cellules intestinales.

L'effet antagoniste de *Saccharomyces boulardii* pourrait également s'expliquer par une compétition entre les sites récepteurs des levures (Ballou, 1976; Kidby et Davies, 1970), et les cellules intestinales (Essner *et al.*, 1978; Ravdin *et al.*, 1985), vis-à-vis de la fixation de l'amibe (Kobiler et Mirelman, 1980; Ravdin et Guerrant, 1982). Cette hypothèse fait actuellement l'objet de recherche sur un modèle *in vitro*.

RÉFÉRENCES

1. Anand B. S., Vinayak V. K., Bushnurmth S. R., Bhagwat A. G., Jain S. K. : Experimental amoebiasis in the guinea-pig: sequential histological abnormalities following intracæcal injection of *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985, 79, 626-630.
2. Anaya-Velazquez F., Martinez-Palomo A., Tsutsumi V., Gonzalez-Robles A. : Intestinal invasive amebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1985, 34, 723-730.
3. Ballou C. E. : Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 1976, 14, 93-158.
4. Bracha R., Kobiler D., Mirelman D. : Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.*, 1982, 36, 396-406.
5. Chadee K., Meerovitch E. : The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as an experimental host for *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1984a, 33, 47-54.
6. Chadee K., Meerovitch E. : *Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the cæcum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1985b, 34, 283-291.
7. Ducluzeau R., Bensaada M. : Effet comparé de l'administration unique ou en continu de *S. boulardii* par l'établissement

FIG. 8. — (Animal 13). La répartition de la colite érosive est caractérisée par une ré-épithélisation de l'ulcération →. HES × 80. Barre 225 µm.

FIG. 9. — (Animal 21). La cicatrisation de l'abcès s'accompagne d'une sclérose œdémateuse ➔. HES × 350. Barre 45 µm.

FIG. 10. — (Animal 17). Chez l'animal traité, il existe également une hypersécrétion de mucus. Noter dans la lumière cœcale, l'existence de nombreuses amibes dégénérées →. (★ : mucus). HES × 350. Barre 45 µm.

FIG. 11. — Aspect histologique normal de la muqueuse cœcale chez l'animal témoin bactérie seule. HES × 240. Barre 75 µm.

FIG. 12. — Aspect histologique normal de la muqueuse cœcale chez l'animal témoin levure seule. HES × 350. Barre 45 µm.

FIG. 13. — Aspect histologique normal de la muqueuse cœcale chez l'animal témoin levure-bactérie. HES × 350. Barre 45 µm.

FIG. 14. — Aspect de colite interstitielle avec infiltration des éléments mononucléés dans le chorion de la muqueuse dont le revêtement de surface est intact. HES × 350. Barre 45 µm.

(L : lumière cœcale; M. M. : musculaire muqueuse; M : musculueuse)

- de diverses souches de *Candida* dans le tractus digestif de souris gnotoxéniques. *Ann. Microbiol.* (I. Pasteur), 1982, 133b, 491-501.
8. Essner E., Schreiber J., Griewski R. A. : Localization of carbohydrate components in rat colon with fluoresceinated lectins. *J. Histochem. Cytochem.*, 1978, 26, 452-458.
 9. Gill N. J., Ganguly N. K., Mahajan R. C., Bhushnurmath S. R., Dilawari J. B. : Histological evolution of caecal lesions in experimental amebiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1984, 78, 631-638.
 10. Kidby D. K., Davies R. : Invertase and disulphide bridges in the yeast wall. *J. Gen. Microbiol.*, 1970, 61, 327-333.
 11. Kobiler D., Mirelman D. : Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect. Immun.*, 1980, 29, 221-225.
 12. Laughlin J., Aley S. : The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.*, 1985, 32, 221-240.
 13. Leitch G. J., Dickey A. V., Udezulu I. A., Gordon B. B. : *Entamoeba histolytica* trophozoites in the lumen and mucus blanket of rat colons studied *in vivo*. *Infect. Immun.*, 1985, 47, 68-73.
 14. Leitch G. J., Haris-Hooker S. A., Udezulu I. A. : Movement of *Entamoeba histolytica* trophozoites in rat caecum and colon intact mucus blankets and harvested mucus gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1988, 39, 282-287.
 15. Lopez-Revilla R., Cano-Mancera R. : Adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes. *Infect. Immun.*, 1982, 37, 281-285.
 16. Lushbaugh W. B., Kairalla A. B., Loadholt C. B., Pittman F. E. : Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 27, 248-254.
 17. Massot J., Desconclois M., Patte F. : Effet protecteur d'un *Saccharomyces* lors d'une injection bactérienne expérimentale chez la Souris. *Bull. Soc. Franç. Mycol. Med.*, 1977, 6, 45-48.
 18. Massot J., Desconclois M., Astoin J. : Protection par *Saccharomyces boulardii* de la diarrhée à *Escherichia coli* du Souriceau. *Ann. Pharm. Franç.*, 1982, 40, 445-449.
 19. Martinez-Palomo A., Gonzalez-Robles A., Chabez B., Orozco E., Fernandez-Castelo S., Cervantes A. : Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.*, 1985, 32, 166-175.
 20. Mirelman D., Feingold C., Wexler A., Bracha R. : Interactions between *Entamoeba histolytica*, bacteria and intestinal cells. *Ciba Found Symp.*, 1983, 99, 2-30.
 21. Mirelman D. : Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.*, 1987, 51, 272-284.
 22. Mora-Galindo J., Martinez-Palomo A., Chavez B. : Interaccion entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal del cobayo. *Arch. Invest. Med. Mex.*, 1978, 9, 261-273.
 23. Mora-Galindo J., Martinez-Palomo A., Gonzalez-Robles A. : Interaccion entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal del cobayo. Estudio cuantitativo. *Arch. Invest. Med. Mex.*, 1982, 13, 233-243.
 24. Orozco E., Martinez-Palomo A., Guarneros G. : Virulencia y propiedades de superficie de *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. Mex.*, 1980, 11, 153-157.
 25. Orozco E., Martinez-Palomo A., Gonzalez-Robles A., Guarneros G., Mora-Galindo J. : Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de *Entamoeba histolytica* a células epiteliales. Relacion de la adhesión con la virulencia de las cepas. *Arch. Invest. Med. Mex.*, 1982, 13, 159-166.
 26. Orozco E., Guarneros G., Martinez-Palomo A., Sanchez T. : *Entamoeba histolytica* phagocytosis as a virulence factor. *J. Exp. Med.*, 1983, 158, 1511-1521.
 27. Perez-Tamayo R. : Pathology of amebiasis. In: *Amebiasis Human Parasitic Diseases*, Martinez-Palomo. *Elsevier Scientific Publications*, New York, 1986, Vol. 2, 71-74.
 28. Phillips B. P., Wolfe P., Riees C. I., Gordon H., Wright W., Reyniers J. : Studies on the Ameba-bacteria relationship in amebiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1985, 4, 675-695.
 29. Pittman F. E., Pittman J. C., El-Hashimi W. K. : Human amebiasis: light and electron microscopic findings in colonic mucosal biopsies from patients with acute amebic colitis. *Proc. Inter. Conf. Amœb. Mex.*, oct. 1975, 398-416.
 30. Ravdin J. I., Croft B., Guerrant R. L. : Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.*, 1980, 152, 377-390.
 31. Ravdin J. I., Guerrant R. L. : Separation of adherence, cytolytic and phagocytic events in the cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. Mex.*, 1982, 13, 123-128.
 32. Ravdin J. I., Guerrant R. L. : A review of the parasite cellular mechanism involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev. Infect. Dis.*, 1982, 4, 1185-1207.
 33. Ravdin J. I., John J. E., Johnston L., Innes D. J., Guerrant R. L. : Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. *Infect. Immun.*, 1985, 48, 292-297.
 34. Ray D. K., Chatterjee D. K. : Caecal amoebiasis in albinos mice an experimental model. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1980, 75, 225-256.
 35. Rigother M. C., Vuong P. N., Gayral P. : Nouveau modèle expérimental d'amibiase cœcale chez le Rat. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1989, 64, 185-199.
 36. Sepulveda B. : Amebiasis: Host-pathogen biology. *Rev. Inf. Dis.*, 1982, 4, 836-842.
 37. Takeuchi A., Jervis H. R., Philipps B. P. : Electron microscopic studies of experimental *Entamoeba histolytica* infection in the guinea pig. III. Histolysis of the cecum. *Virchows Arch. Cell. Path.*, 1977, 24, 263-277.
 38. Taylor A. E., Baker J. R. : Amœbae. In: *The cultivation of parasites in vitro*, Adlard (ed.). *Blackwell Scientific Publication*, Oxford, 1968, 120-153.
 39. Toothaker R. D., Elmer G. W. : Prevention of clindamycin-induced mortality in hamsters by *Saccharomyces boulardii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1984, 26, 552-556.
 40. Vinayak V. K., Naik S. R., Sawbrey S., Sehmi N., Chuttari P. N. : Pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. Virulence of strains of amoebae from symptomatic and asymptomatic cases of amebiasis. *Indian J. Med. Res.*, 1977, 66, 935-941.
 41. Woolfe G. : Chemotherapy of amebiasis. In: *Experimental chemotherapy*, Schnitzer R. L., Hawking F. (eds). *Academic Press*, New York, 1963, Vol. 1, 355-443.